

研究報告書

研究課題名：
耐病性植物作出を目指した植物細胞死制御系の解明

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名： 初谷 紀幸

(研究期間： 2005 年 10 月 1 日～ 2009 年 3 月 31 日)

研究報告書

1. 研究課題名

耐病性植物作出を目指した植物細胞死の制御系の解明

2. 氏名

初谷 紀幸

3. 研究のねらい

これからの農業では、植物が本来もつ自己防衛能力を強化した耐病性作物の分子育種が注目されている。その技術基盤として、病原体感染に対する植物の生体防御機構を分子レベルで解明することが緊急かつ必須の課題である。植物は病原体の感染から身を守るために様々な防御系を進化させてきた。そのなかでも、汎用性の高い防御戦略が、病原体の認識に基づいて誘導される「過敏感細胞死(hypersensitive cell death)」である。過敏感細胞死は感染を受けた細胞が自らを犠牲にして自発的に死ぬことによって、病原体を封じ込め、周囲の健全細胞への感染拡大を抑制する防御機構である。私はこれまでに植物に固有の液胞が細胞の生死を決定する重要なオルガネラであることを明らかにしてきた。本さきがけ研究では、細胞死実行過程の液胞に着目し、過敏感細胞死の分子機構を解明することによって、植物独自の細胞死システムを提唱することを目指した。植物が獲得した生体防御戦略を理解し、細胞死における液胞の機能を制御することで病害抵抗性作物の分子育種に役立てようとするものである。

4. 研究成果

高等植物は、発生の過程や感染防御の過程で一部の細胞を死に至らせる能力を備えている。この植物の細胞死のシステムは動物のシステムとは大きく異なる。動物では老廃細胞は貪食細胞マクロファージによって補食・消化される。しかし、植物はマクロファージをもたないため、細胞が死に向かう際には細胞内成分を自力で分解しなければならない。私はこの際の速やかな分解に液胞が重要な役割を果たしていると考えている。プログラムされた細胞死は植物細胞と動物細胞の両方にとって基本的な生理プロセスであり、両者には共通した分子機構が働いているとする研究も多数ある。例えば、動物の細胞死の実行因子として知られるCaspase活性は、植物の細胞死の局面でも検出され、特にCaspase-1とCaspase-3の阻害剤で細胞死が抑制されるという報告もある。しかしながら、国内外の多くの研究者の努力にも関わらず、Caspase活性をもつ分子は長い間不明であった。私はこれまでに逆遺伝学的解析などからCaspase-1活性を示す酵素の実体が液胞プロセシング酵素(VPE, Vacuolar Processing Enzyme)であることを見出した。またVPEは病原ウイルス(*Tobacco mosaic virus*)の感染に対する植物の防御機構を制御することを証明した。VPEはウイルス感染にともない液胞の崩壊を導くことによって細胞死を引き起こす。

本さきがけ研究では、シロイヌナズナにおいて植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) strain DC3000 (*avrRpm1*)を接種した際に誘導される防御発現系をモデルとして、植物の耐病性に重要な役割を担っている「過敏感細胞死」について研究を進めた。*Pseudomonas* 属菌による農作物被害は世界的にも深刻で、既発生国および未発生国ともにその防除には多大の関心が寄せられており、研究対象として興味深い。

植物の Caspase-3 様活性を示す酵素の実体

シロイヌナズナの葉に *Pst* DC3000 (*avrRpm1*)を接種すると、12時間以内に過敏感細胞死が誘導され、感染細胞は死に至る。この過敏感細胞死がプロテアソームの阻害剤で抑制されることを見出した。さらに、Caspase様の活性をもつプロテアーゼが関与する可能性について調べるためにCaspase-1およびCaspase-3の阻害剤を処理したところ、Caspase-3阻害剤で過敏感細胞死が抑制された。この結果は、シロイヌナズナの過敏感細胞死にCaspase-3様の活性を持つプロテアーゼが関与することを示唆する。

シロイヌナズナにおける Caspase-3 様活性およびプロテアソーム活性を測定した。Caspase-3 様活性はプロテアソーム阻害剤で抑制され、一方、プロテアソーム活性は Caspase-3 阻害剤で抑制された。この結果はプロテアソームに Caspase-3 様活性があることを示唆している。プロテアソームは 3 つのサブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ にプロテアーゼ活性をもつ。シロイヌナズナの $\beta 1$ タンパク質は *PBA1* 遺伝子によってコードされている。内在性の *PBA1* の発現を抑制したシロイヌナズナ (*ipba1*) を作製し、プロテアソーム活性と Caspase-3 様活性を比較した。*ipba1* 植物ではプロテアソーム活性とともに Caspase-3 様活性が低下しており、両者の活性は相関関係を示した。この結果はシロイヌナズナにおける Caspase-3 様活性を示す酵素の実体がプロテアソームの *PBA1* であることを示している。

プロテアソームは過敏感細胞死を制御する

過敏感細胞死におけるプロテアソームの関与について調べるために *ipba1* 植物に *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種した。野生型のシロイヌナズナに *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種すると、感染を受けた細胞は過敏感細胞死を起こし、図1に示すように死細胞がトリパンブルーで青色に染色される。一方、*ipba1* 植物では過敏感細胞死が起らず(図1)、病原細菌が増殖していた。この結果は明らかにプロテアソームが過敏感細胞死において重要な役割を担っていることを示している。

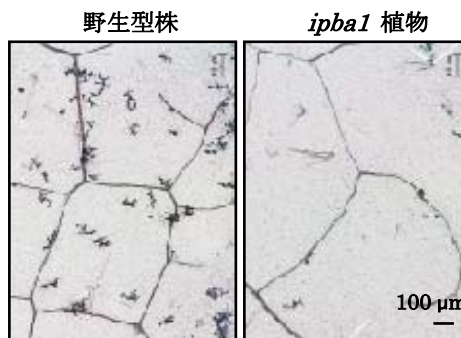


図1. 病原細菌 *Pst*. DC3000 (*avrRpm1*) を接種した葉のトリパンブルー染色。野生型株では染色された死細胞が観察されるが、*ipba1* 植物では染まった細胞が観察されず、細胞死が抑制されている。

過敏感細胞死におけるプロテアソームの役割

過敏感細胞死を起こしつつある細胞の形態変化を電子顕微鏡レベルで観察した。接種後 3 時間目の細胞に注目すると、液胞膜が細胞膜と融合することが分かった(図2)。このような膜融合は、*ipba1* 植物の細胞では観察されなかった。

液胞膜と細胞膜の融合をリアルタイムで観察するために、細胞膜を GFP-PIP2a で可視化し、液胞膜を RFP-Vam3 で可視化した。感染後 3 時間目の細胞において、細胞膜 GFP-PIP2a (緑) と液胞膜を RFP-Vam3 (赤) が融合し、オレンジ色 (緑+赤) になった。この膜融合は、プロテアソームの阻害剤を添加することによって抑制された。膜融合により液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることが期待できる。これについて検討するために、液胞局在型の GFP を導入したシロイヌナズナに *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) を接種し、GFP 蛍光の挙動を観察した。その結果、接種後約 4.5 時間で、GFP 蛍光が細胞外で検出された。この GFP 蛍光の漏出はプロテアソームの阻害剤を添加することによって阻害された。これら結果は、プロテアソームが植物の細胞死の過程において液胞膜と細胞膜の融合に関わっており、膜融合の結果、液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることを示唆する。

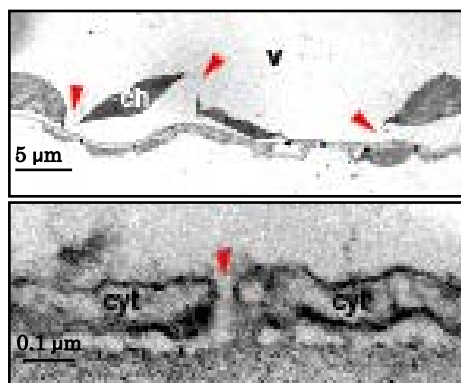


図2. 病原細菌 *Pst*. DC3000 (*avrRpm1*) を接種した葉の電子顕微鏡写真。矢頭で示す部分で液胞膜と細胞膜が融合している。

プロテアソーム/Caspase-3 様活性が制御する過敏感細胞死は、VPE/Caspase-1 様活性が関わる細胞死機構と同様に液胞が重要な役割を担っていた。しかし、植物の感染防御戦術という視点から見ると、液胞の役割は大きく異なっていた。植物は病原体の生活様式(細菌は植物の細胞間隙で増殖する、一方ウイルスは植物細胞内に侵入し増殖する。)の違いによって全く異なる感染防御戦術(細胞死メカニズム)を発動することが示唆された。プロテアソーム/Caspase-3 様活性が制御する防御戦術の大きな特徴は、液胞膜が細胞膜と融合することである。これによって、植物細胞は液胞内の分解酵素や抗菌物質を細胞外に放出し、細胞間隙に潜む細菌を攻撃すると同時に自らも死に至る。一方、これら抗菌物質はウイルスに対する効果は低く、ウイルスは細菌と

異なり細胞内に侵入し増殖する。VPE/Caspase-1 様活性を介する防御戦術では、液胞の崩壊を導くことによって素早く感染細胞を死に至らせることが特徴である。この戦術は、細胞内で増殖するウイルスにとっては効果的である。これまではウイルス、細菌、カビすべての病原体に対して植物は共通した防御戦術を発動している信じられてきた。ところが、本研究成果は、病原体それぞれの生活様式に応じた防御戦術を植物は進化させてきたことを示唆している。

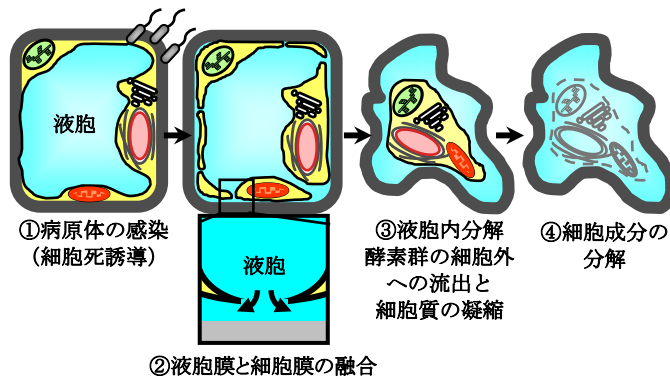


図3. 細胞死モデル

①病原体の感染により過敏感細胞死のスイッチがオンになる。②プロテアソーム依存的に液胞膜と細胞膜が融合し、その結果、液胞内分解酵素群が細胞外に放出される。③細胞質が凝集し、④自らを分解し細胞は死に至る。

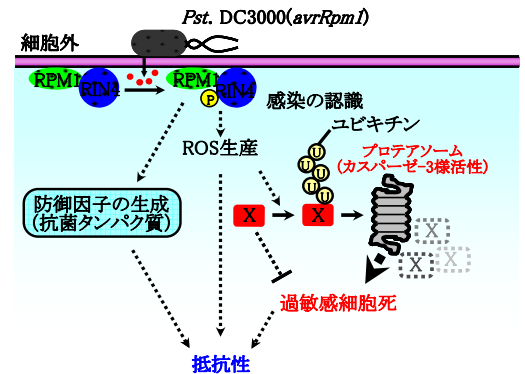


図4. 細胞死の分子メカニズム仮説

プロテアソームはポリユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することから、過敏感細胞死を負に制御する因子“X”（プロテアソームの基質）の存在を仮定し、分子モデルを考えた。感染シグナル伝達の結果、“X”がユビキチン化される。ポリユビキチン化された“X”がプロテアソームで分解されることによって細胞死が実行される。

5. 今後の展開

シロイヌナズナのプロテアソームの機能を減弱させると、*P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (avrRpm1) の感染にともなう過敏感細胞死が阻害されることから、ユビキチン／プロテアソーム系が植物の病害抵抗性を制御していることが分かった。残された課題としては、過敏感細胞死におけるプロテアソームの標的タンパク質の同定がある。これによって、ユビキチン／プロテアソーム系のプログラム細胞死における機能の解明に繋がる。

今後の期待として、プロテアソームの標的タンパク質を発現制御することによって、病害抵抗性作物の分子育種に役立てることができると考えられる。従来分子育種では主にある特定の病原菌に対してのみ効果を発揮する遺伝子を一一つ導入することにより、抵抗性品種を作ってきた。しかし、このような作物は「病原菌の変異」や「新種の病原菌」には対応できず、抵抗性品種が突如として感受性品種となり甚大な被害をもたらすケースが多発する。抵抗性品種の育種は病原体の進化戦略との「いたちごっこ」であった。一方、過敏感細胞死は汎用性の高い防御機構である。したがって植物が本来もつ自己防衛能力としての過敏感細胞死を制御することによって、「病原菌の変異」や「新種の病原菌」に対しても安定した抵抗性品種の育種が可能となることを期待できる。

6. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hatsugai N, Kuroyanag M, Nishimura M, Hara-Nishimura I, A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death, *Apoptosis*, vol. 6, 905-911 (2006)
2. Saska I, Gillon AD, Hatsuga Ni, Dietzgen RG, Hara-Nishimura I, Anderson MA, Craik DJ, An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein backbone cyclization, *J. Biol. Chem.*, vol. 282, 29721-29728 (2007)
3. Ogasawara K, Yamada K, Christeller JT, Kondo M, Hatsugai N, Hara-Nishimura I,

Nishimura M, Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases, *Plant Cell Physiol.*, in press

(2)特許出願
なし

(3)その他の成果

(A)学会発表

1. 初谷紀幸、西村幹夫、西村いくこ、液胞プロセシング酵素が制御するプログラム細胞死機構の解明、植物科学研究プロジェクトシンポジウム(東京)(2005年12月2日)
2. 西村いくこ、初谷紀幸、黒柳美和、中畦悟、プログラム細胞死を制御する液胞プロセシング酵素 VPE、第28回日本分子生物学会年会(福岡)(2005年12月9日)
3. Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Nishimura M, Hara-Nishimura I, Involvement of VPE exhibiting caspase-1 activity in hypersensitive cell death, XII International Congress on MPMI 2005, Cancun, Mexico (2005/12/14-19)
4. Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nakaune S, Yamada K, Nishimura M, A VPE exhibiting caspase-1 activity regulates pathogen-induced cell death and developmental cell death in plants, XII International Congress on MPMI 2005, Cancun, Mexico (2005/12/14-19)
5. 黒柳美和、山田健志、初谷紀幸、近藤真紀、西村幹夫、西村いくこ、液胞プロセシング酵素は植物の抵抗性反応と罹病性反応における細胞死に関与する、日本植物生理学会年会(つくば)(2006年3月19日)
6. Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nakaune S, Kunieda T, Takahashi K, Nishimura M, Vacuolar processing enzyme (VPE): an executor of vacuole-mediated cell death in plants, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan (2006/6/19)
7. 初谷紀幸、黒柳美和、中畦悟、西村いくこ、液胞プロセシング酵素が制御する植物のプログラム細胞死、日本分子生物学会2006フォーラム(名古屋)(2006年12月8日)
8. 初谷紀幸、田村謙太郎、西村いくこ、過敏感細胞死における細胞内膜系の関与、第48回日本植物生理学会年会(松山)(2007年3月29日)
9. 初谷紀幸、田村謙太郎、西村いくこ、植物の感染防御機構における細胞内輸送系の関与、第49回日本植物生理学会年会(札幌)(2008年3月20日)
10. 小笠原希実、山田健志、初谷紀幸、西村いくこ、西村幹夫、シロイヌナズナにおける恒常型および誘導型ERボディの比較解析、第49回日本植物生理学会年会(札幌)(2008年3月20日)
11. 初谷紀幸、岩崎慎治、西村いくこ、プロテアソームを介した植物の感染防御機構、BMB2008(神戸)(2008年12月10日)
12. 初谷紀幸、岩崎慎治、西村いくこ、プロテアソームが制御する過敏感細胞死の分子機構、第50回日本植物生理学会年会(名古屋)(2009年3月21日)
13. 小笠原希実、初谷紀幸、山田健志、西村いくこ、西村幹夫、シロイヌナズナの感染防御機構におけるERボディ内容物PYK10の役割、第50回日本植物生理学会年会(名古屋)(2009年3月21日)
14. 運天修、初谷紀幸、富士健太郎、山崎美紗子、西村いくこ、シロイヌナズナの病害抵抗性における細胞内輸送の関与、第50回日本植物生理学会年会(名古屋)(2009年3月21日)

(B)受賞
なし

(C)著作物
なし